(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENT- UND MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**

(10) **DE 198 30 618 A 1**

(51) Int. Cl.[7]:
C 08 B 37/00
C 08 J 3/03
A 23 L 1/0522

(21) Aktenzeichen: 198 30 618.0
(22) Anmeldetag: 9. 7. 1998
(43) Offenlegungstag: 13. 1. 2000

(71) Anmelder:
Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG, 65929 Frankfurt, DE

(72) Erfinder:
Bengs, Holger, Dr., 60598 Frankfurt, DE; Jacobasch, Gisela, Prof., 16348 Wandlitz, DE; Schmiedl, Detlef, Dr., 14558 Bergholz-Rehbrücke, DE; Riesmeier, Jörg, Dr., 14473 Potsdam, DE; Quanz, Martin, Dr., 14473 Potsdam, DE; Bäuerlein, Michael, Dr., 14473 Potsdam, DE; Provart, Nicholas, Dr., 14473 Potsdam, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) -Amylase resistente Polysaccharide, Herstellungsverfahren, Verwendung und Lebensmittel mit diesen Polysacchariden

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α-Amylase-restistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt, umfassend folgende Schritte:
a) Herstellung eines Kleisters aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-glukanen) und Wasser;
b) Erwärmung des Kleisters;
c) abkühlung des Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
d) ggf. Trocknung des erhaltenen Produktes.

DE 198 30 618 A 1

Beschreibung

Der Einsatz resistenter Stärken (RS) hat für die Lebensmittelindustrie eine zunehmend größere Bedeutung. Aus dem Abbau von RS-Produkten gewinnt der Organismus nur in geringem Umfang Energie. Diese Energiezufuhr bezieht sich ausschließlich auf den oxidativen Abbau resorbierter kurzkettiger Fettsäuren aus dem Dickdarm. Diese kurzkettigen Fettsäuren sind Endprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels der intestinalen Mikroflora. Mit der Aufnahme RS-haltiger Lebensmittel sind zwei Funktionen verknüpft, Substratbereitstellung für den Energiestoffwechsel der intestinalen Mikroflora und den der Dickdarmepithelzellen. Letztere sind zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion auf eine luminale Zufuhr der kurzkettigen Fettsäuren und insbesondere von Butyrat angewiesen.

Seit langem ist bekannt, daß der Gehalt an hochverzweigtem Amylopektin in Stärken, die gewöhnlich aus Amylose und Amylopektin variierender Zusammensetzung bestehen, durch gezielte enzymatische Behandlung reduziert wird, wodurch der Anteil an kurzkettigen Amylosestrukturen erhöht werden kann (US Patent 3,729,380). Es ist ebenfalls bekannt, daß derartige Produkte eine stärkere Tendenz zur Retrogradation als native Stärken besitzen. Bei diesem Prozeß bilden sich sogenannte α-Amylaseresistente Stärkestrukturen aus. Als resistente Stärke (RS) werden Kohlenhydratpolymere bezeichnet, die durch α-Amylase nicht abgebaut werden. Sie stellen dadurch eine energiereduzierte, körpergebende Komponente in Lebensmittelzusammensetzungen im Sinne eines Ballaststoffes dar. Die Behandlung mit entzweigenden Enzymen findet aus technischen Gründen gewöhnlich in einem nicht zu konzentrierten wässrigen Stärkekleister statt.

EP 0 564 893 A1 beschreibt und beansprucht einen Prozeß für die Herstellung eines RS-Produktes, das bis zu 15% RS enthält. Dieser Prozeß ist dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Suspension einer Stärke, die mindestens 40% Amylose enthält, verkleistert und enzymatisch durch Behandlung mit einem Enzym, das die α-1,6-glykosidischen Bindungen öffnet, entzweigt und anschließend das entstandene Zwischenprodukt retrogradiert wird. Nach EP 0 564 893 A1 liegt die optimale Stärkekonzentration in der Suspension bei 15% und die Beispiele dieser EP-Patentanmeldung illustrieren den Prozeß, wenn die Stärkekonzentrationen entweder auf 14% reduziert bzw. auf 17% erhöht werden. Das Ausgangsmaterial enthält mindestens 40% Amylose und ist eine Maisstärke. Es wird weiterhin gezeigt, daß bei einem Amylosegehalt von 25% durch diesen Prozeß keine resistente Stärke (RS) gebildet wird. Außerdem wird nachgewiesen, daß bei Erhöhung des Amylosegehaltes über 40% auf bis zu 100% ein Produkt erzeugbar ist, daß bis zu 50,3% RS enthält.

EP 0 688 872 A1 beschreibt und beansprucht einen Prozeß für die Herstellung eines RS-haltigen Produktes, das 25 bis 50 Gew.-% an RS enthält. Entsprechend den Angaben beschreibt und beansprucht EP 0 688 872 A1 einen Prozeß für die Herstellung eines RS-haltigen Produktes, in dem eine wässrige Suspension einer partiell abgebauten, verkleisterten Stärke enzymatisch entzweigt und das Zwischenprodukt retrogradiert wird.

(In diesem Zusammenhang wird als "partiell abgebaute Stärke" ein Polymer verstanden, das durch geeignete Behandlung im Molekulargewicht reduziert wurde, wobei die Verkürzung der Kettenlänge sowohl die Amylose als auch das Amylopektin betrifft. Die Degradation schließt sowohl Hydrolyseprozesse (säure- oder enzymkatalysierte) als auch Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse ein).

Besonders hervorgehoben werden säureabgebaute Wurzel- oder Knollenstärken sowie Maltodextrine von Wurzel- oder Knollenstärken. Maltodextrine sind durch einen DE-Wert (DE: Dextrose Äquivalent) im Bereich von 1 bis 19 charakterisiert. Sie werden aus Kartoffel- oder Tapiokastärke, die bis zu 25% Amylose enthalten, hergestellt. Die wässrige Suspension solcher Maltodextrine enthält für den Prozeß einen Feststoffanteil von 20 Gew.-% oder mehr. Die Maltodextrine sind weiterhin dadurch charakterisiert, daß sie hohe Gehalte an Oligomeren mit Polymerisationsgraden kleiner als 10 (DP < 10) von bis zu 22 Gew.-% enthalten sowie ein mittleres Molekulargewicht von $1{,}3680 \times 10^4$ g/mol. Die entzweigenden Enzyme, die für den bekannten Prozeß genutzt werden, sind Pullulanase und Isoamylase. Am Ende der enzymatischen Behandlung wird eine Retrogradation in einem Temperaturbereich von 0 bis 30°C in einem Zeitintervall von 1 bis zu 3 Tagen durchgeführt, in dem man das wässrige Reaktionsprodukt stehenläßt. Anschließend wird das Produkt durch Sprühtrocknung getrocknet. Es wird ein pulverförmiges Produkt mit einem RS-Gehalt bis zu maximal 60 Gew.-% hergestellt.

Die Erfindungsbeschreibung dient dem Ziel, Kohlenhydratpolymere mit einem hohen Anteil resistenter, relativ thermostabiler Strukturen ökonomisch herzustellen, um sie in der Lebensmittelherstellung einsetzen zu können.

So betrifft eine Ausführungsform der Erfindung α-Amylase-resistente Polysaccharide, die Poly-(1,4-α-D-glukane) sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% aufweisen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter einem RS-Gehalt den Gehalt an α-Amylase-resistenten Polysacchariden, wie er nach der Methode von Englyst et al. (Classification and measurement of nutritionally important starch Fractions, European Journal of Clinical Nutrition, 46 (Suppl. 23) (1992) 33–50) bestimmt werden kann; s. auch Beispiel 3.

Die erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharide können gekennzeichnet sein durch einen RS-Gehalt von mindestens 75 und insbesondere mindestens 95 Gew.-%.

Ferner können die erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß die Poly-(1,4- α-D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.

So können die Poly-(1,4-α-D-glukane) durch Veretherung oder Veresterung in 2-, 3- oder 6-Position chemisch modifiziert worden sein. Der Fachmann ist mit chemischer Modifizierung hinlänglich vertraut; vgl. beispielsweise folgende Literatur:

1. Functional Properties of Food Components, 2nd edition, Y. Pomeranz, Academic Press (1991).
2. Lehrbuch der Lebensmittelchemie; Belitz & Grosch, Springer Verlag (1992).
3. Citrat Starch Possible Application as Resistent Starch in Different Food Systems, B. Wepner et al., European Air Concerted Action, Abstract: air3ct94-2203, Functional Properties of Non-digestible Carbohydrates, Pro Fibre-Tagung, Lissabon, Februar 1998, Seite 59.

Ferner können die erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß sie in

6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5% aufweisen.

Ferner können die erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß sie in 2- und/oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1,0% und insbesondere höchstens 0,5% aufweisen.

Ferner können die α-Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß die Poly-(1,4-α-D-glukane) ein Molekulargewicht von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7, bevorzugt 10^3 bis 10^6 und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 g/mol aufweisen und/oder wasserunlöslich sind.

Ferner können die erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß die Poly-(1,4-α-Dglukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichtes) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

Ferner können die erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharide nach einem Verfahren erhältlich sein umfassend folgende Schritte:

a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;
b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
d) ggf. Trocknung des erhaltenen Produktes.

Unter dem Begriff "wasserunlöslich" versteht man Verbindungen, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft/Stuttgart & Gori-Verlag/Frankfurt, 9. Aufl., 1987; s. auch Beispiele 22 bis 23) unter die Kategorie "schwer lösliche" Verbindungen, "sehr schwer lösliche" oder "praktisch unlösliche" Verbindungen fallen.

Der Fachmann ist mit den Begriffen "Suspension" und "Dispersion" vertraut. Ergänzend sei verwiesen auf Römpp, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart & New York, Seiten 4401 bzw. 1010.

Der Fachmann ist ferner mit dem Begriff "Kleister" vertraut. Ergänzend sei verwiesen auf Römpp, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart & New York, Seite 2256.

Ferner können die erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharide nach einem Verfahren erhältlich sein umfassend folgende Schritte:

a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;
b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;
c) Retrogradation;
d) Auftauen der nach Schritt c) erhaltenen Masse; und
e) ggf. Trocknung der nach Schritt d) erhaltenen Masse oder Entwässerung der erhaltenen Masse.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α-Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend folgende Schritte:

a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;
b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
d) ggf. Trocknung des erhaltenen Produktes.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens kann darin bestehen, daß aus den oben beschrieben Ausgangsstoffen ein wässriger heißer Kleister herstellbar ist, der bis zu beispielsweise 30 Gew.-% oder mehr Feststoffanteile enthält, ohne daß beispielsweise eine Entzweigung oder ein partieller Abbau bzw. eine Kettenlängenreduktion der verwendeten Ausgangsstoffe vorgenommen werden muß. Dies führt zu einer Vereinfachung der Prozeßführung und damit zu einer Reduzierung der Kosten des Verfahrens, weil der Zeit- und kostenaufwendige Einsatz ent weigender Enzyme bzw. degradierender Chemikalien entfällt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (a) einen Kleister mit einem Polysaccharid-Gehalt von mindestens etwa 5 und bis zu etwa 30, 35, 40, 45 oder 50 Gew.-% herstellt.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (b) den Kleister auf eine Temperatur im Bereich von Raumtemperatur, 50, 60 oder 70 bis 100°C erwärmt oder erhitzt.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (c)

(i) bei einer Temperatur im Bereich von 50°C bis an den Gefrierpunkt, vorzugsweise 35 bis 15°C, 27 bis 22°C, 16 bis 0°C oder 6 bis 2°C und/oder
(ii) für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, vorzugsweise 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h

retrogradiert.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (c) nach einem Temperaturstufenprogramm

(i) in einem Temperaturbereich von 100 bis 0°C und vorzugsweise 90 bis 4°C
(ii) für ein Gesamtzeitintervall von 8 bis 36 h, vorzugsweise 20 bis 28 h und insbesondere 22 bis 26 h gemäß dem

folgenden Temperatur-Zeit-Programm stufenweise und gegebenenfalls unter Einwirkung von Scherkräften abkühlt und retrogradiert, wobei sich die gewählten Zeitintervalle zu einem vorstehend angegebenen Gesamt-Zeitintervall ergänzen:

Temperatur-Zeit-Programm

Temperatur(°C)	Zeitintervall
90 ± 10	5 min ± 5 min
80 ± 10	10 min ± 10 min
70 ± 10	(30 bis 180 min)± 30 min
40 ± 10	(60 bis 180 min)± 60 min
25 ± 10	22 h ± 15 h
4 ± 10	20 h ± 15 h

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α-Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend folgende Schritte:

a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;
b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;
c) Retrogradation;
d) Auftauen der nach Schritt c) erhaltenen Masse; und
e) ggf. Trocknung der nach Schritt d) erhaltenen Masse oder Entwässerung der erhaltenen Masse.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dadurch gekennzeichnet sein, daß man die gemäß Schritt (d) aufgetaute Masse noch einmal oder mehrmals den Schritten (b) bis (d) unterwirft, bevor man endgültig auftaut, trocknet oder entwässert.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (b) die erhaltene Suspension oder Dispersion auf eine Temperatur im Bereich 0°C bis -80°C abkühlt.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (c) für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, bevorzugt 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h retrogradiert.

Die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens können dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Stufe (a) von Poly-(1,4-α-D-glukanen) ausgeht, die aus Biotransformation, aus Umsetzung mit Enzymen oder aus Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen worden sind; vgl. beispielsweise WO 95 31 553.

Unter einer Amylosucrase versteht man ein Enzym, das die folgende Reaktion katalysiert:

Saccharose + (α-1,4-Glukan)n ↔ Fruktose + (α-1,4-Glukan)n+1

Ausgehend von diesem Reaktionsschema können lineare oligomere oder polymere α-1,4-Glukane als Akzeptoren für eine kettenverlängernde Reaktion dienen, die zu wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) führt, deren Glukoserest durch α-1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind und die ein Molekulargewicht im Bereich von $0{,}75 \times 10^2$ g/mol bis 10^7 g/mol aufweisen.

Die linearen oligomeren oder polymeren Akzeptoren können dabei entweder von außen zugesetzt werden, sie können jedoch auch, wie in Beispiel 1 beschrieben, durch die Amylosucrase selbst aus Saccharose erzeugt werden.

α-1,6-glykosidische Bindungen sind in diesen Produkten per ^{13}C-NMR nicht nachweisbar (Remaud-Simeon et al. in Carbohydrate Bioengeneering (ed. S. B. Petersen et al.), Elsevier Science B. V. (1995), 313–320).

Auch wasserunlösliche Poly-(1,4-α-D-glukane), die die eben beschriebenen Eigenschaften aufweisen, aber auf anderem Wege erzeugt worden sind, können Ausgangsstoffe des erfindungsgemäßen Verfahrens sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man wasserunlösliche Poly-(1,4-α-Dglukane) als Ausgangsstoffe, die durch die Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase unter Einsatz von verzweigten Polysaccharidakzeptoren, wie z. B. Glykogen, Amylopektin, Dextrin, gewonnen werden können. Die Amylosucrase katalysiert eine α-1,4-Glukankettenverlängerung an diesen verzweigten Polysaccharidakzeptoren. Die dabei entstehenden wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) weisen im Vergleich zu den eingesetzten verzweigten Polysaccharidakzeptoren einen geringeren Verzweigungsgrad auf. Auch diese Produkte werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Poly-(1,4-α-D-glukane) bezeichnet.

Auch solche wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane), die die eben beschriebenen Eigenschaften aufweisen, aber auf anderem Wege erzeugt worden sind, können Ausgangsstoffe des erfindungsgemäßen Verfahrens sein.

Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.

Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5% aufweisen.

Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) in 2- oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1% und insbesondere höchstens 0, 5% aufweisen.

Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) ein Molekulargewicht von $0{,}75 \times 10^2$ bis 10^7, bevorzugt 10^3 bis 10^6 g/mol und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 aufweisen.

Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichts) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

Unter dem Begriff "hoher RS-Gehalt" versteht man einen RS-Gehalt von mindestens 25%, bevorzugt von 65 bis 75, 75 bis 88, 88 bis 90, 90 bis 95 und insbesondere 95 bis 99 oder mehr Gew.-%.

So können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß man α-Amylase-resistente Polysaccharide mit einem RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% gewinnt.

Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei den Trocknungsschritten (e) bzw. (d) das retrogradierte Produkt durch Sprüh- oder Gefriertrocknung trocknet.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Verwendung eines erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharids für Lebensmittel-Vorprodukte oder Lebensmittel.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Verwendung eines erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharids als Lebensmitteladditiv oder Lebensmittelzusatzstoff.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung ein Lebensmittel-Vorprodukt oder Lebensmittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem erfindungsgemäßen α-Amylase-resistenten Polysaccharid.

Beispiel 1

Biotransformation

In einem 5 l-Gefäß werden 5 l einer sterilisierten 30-proz. Saccharose Lösung gegeben. Ein Enzymextrakt, der eine Amylosucrase aus Neisseria polysaccharea enthält (s. WO 95 31 553), wird in einer Portion zugegeben und gemischt. Die eingesetzte Enzymaktivität beträgt in diesem Experiment 148000 Units. Das verschlossene Gefäß wurde bei 37°C inkubiert. Während der Dauer der Biotransformation bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wird nach 39 h beendet. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, bei –70°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Masse des gefriergetrockneten Feststoffes beträgt 526,7 g (70,2% Ausbeute).

Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker werden 200 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei –70°C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wird nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay[1] bestimmt und beträgt 4,61 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff (4,6%). Der Gehalt an Saccharose liegt unter der Nachweisgrenze.

Der Überstand der Biotransformation wird bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei –70°C eingefroren und über 3 Tage bei 4°C aufgetaut. Der so erzeugte Niederschlag wurde bei –70°C eingefroren und gefriergetrocknet.

Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker werden 39,5 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei –70°C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wird nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay gemäß STITT et al. (Meth. Enzym., 174 (1989) 518–552) bestimmt und beträgt 2,27 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff. Der Gehalt an Saccharose liegt unter der Nachweisgrenze.

Beispiel 2

Ausgangsmaterial

Bestimmung des Molekulargewichts des mit Amylosucrase synthetisierten wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukans) aus Beispiel 1 (**Fig.** 1).

Es werden 2 mg des Poly-(1,4-α-D-glukans) aus Beispiel 1 bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert (2 µm). Ein Teil der Lösung wird in eine Säule der Gelpermeationschromatographie injiziert. Als Elutionsmittel wird DMSO verwendet. Die Signalintensität wird mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1.0 ml pro Minute.

Die Messung ergibt ein Zahlenmittel des Molekulargewichts (M_n) von 2.326 g/mol und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts (M_w) von 3.367 g/mol. Die Wiederfindungsrate beträgt 100%.

Beispiel 3

Beispiel zur Bestimmung des RS-Gehaltes

200 mg (Trockengewicht) eines auf seinen RS-Gehalt zu analysierenden pulverförmigen Produktes wurden nach der Methode von Englyst et al. (Eur. J. Clin. Nutrition, 46 (1992) (Suppl. 2) S 33–550) zur Bestimmung des RS-Gehaltes mit der beschriebenen Enzymmischung bei pH 5,2 120 min inkubiert. Nach Beendigung des enzymatischen Abbaus wurde die Aktivität der Enzyme durch Erniedrigung des pH-Wertes auf einen Wert von 3 und der Temperatur auf 20°C gestoppt. Anschließend erfolgte durch Zugabe der 4-fachen Menge an Ethanol die Einstellung einer 80-proz. (v/v) ethanolischen Lösung. Die 80-proz. ethanolische Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (2500 × g, 10 min) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde dreimal mit 80-proz. (v/v) Ethanol und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und gewogen. Die Trokkenmasse des Rückstandes wurde bestimmt und der RS-Gehalt nach folgender Gleichung berechnet:

RS [%] = 100 × Gewicht des Rückstandes (Trockengewicht)/Einwaage (Trockengewicht)

Beispiele 4 bis 7

Ein lineares, naturidentisches Poly-(1,4-α-D-glukan) (siehe Beispiel 1) wurde in wässriger Lösung erhitzt und ein Kleister gebildet. Dieser Kleister wurde auf 10 Gew.-% Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei 4 und 25 °C (Beispiel 5 bzw. 6) oder mit Hilfe eines Stufenprogramms (Beispiel 7) retrogradiert. Des weiteren wurde das lineare Kohlenhydratpolymer aus dem Reaktionsansatz ausgefroren (Beispiel 4). Die retrogradierten Muster wurden getrocknet und die Bestimmung des RS-Gehaltes wie oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle 2 illustriert den Einfluß der Retrogradationstemperatur und -bedingungen auf den RS-Gehalt im Produkt, hergestellt aus einem 10-proz. Kleister der verwendeten Poly-(1,4-α-D-glukane) durch 24-stündige Retrogradation.

Tabelle 2

Beispiel	Retrogradations-temperatur	RS [Gewicht-%]
4	-70 °C	78 ± 4
5	4 °C	70 ± 2
6	25 °C	87 ± 1
7	Stufenprogramm	74 ± 3

Dieses Beispiel in Tabelle 2 zeigt, daß die Retrogradationstemperatur den RS-Gehalt beeinflußt. So führt eine Retrogradation bei 25°C zu einem deutlich höheren RS-Anteil verglichen mit einer Retrogradation bei 4°C. Durch Retrogradation bei -70°C erhält man hingegen einen leicht höheren RS-Anteil verglichen mit dem nach Retrogradation bei 4°C. Das Ausgangsprodukt verhält sich dementsprechend anders als Maltodextrine, wie sie in EP 0 688 872 A1 beschrieben und beansprucht werden.

Beispiele 8 bis 12

Das gleiche wie unter Beispielen 4 bis 7 verwendete Poly-(1,4-α-D-glukan) wurde in wässriger Lösung erhitzt, um einen Kleister zu bilden. Dieser wurde auf 10 und 30 Gew.-% Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei 4 und 25 °C oder mit Hilfe eines Stufenprogramms retrogradiert.

Tabelle 3 illustriert den Einfluß des Feststoffanteils im Kleister auf den RS-Gehalt im Produkt, hergestellt aus 10 und 30-proz. Kleister des verwendeten Poly-(1,4-α-D-glukans) durch 24-stündige Retrogradation.

Tabelle 3

		Feststoffanteil	
		10 %	30 %
Beispiel	Retrogradations-temperatur	RS [Gew.-%]	RS [Gew.-%]
8	4 °C	70 ± 2	
9	4 °C		94 ± 2
10	25 °C	87 ± 1	
11	25 °C		93 ± 1
12	Stufenprogramm	74 ± 3	-

Dieses Beispiel in Tabelle 3 zeigt, daß der Feststoffanteil im Kleister den RS-Gehalt beeinflußt. So führt eine Retrogradation bei 30% Feststoffanteil zu einem deutlich höheren RS-Gehalt im Produkt verglichen mit einer Retrogradation bei einem 10-proz. Feststoffanteil. Das Ausgangsprodukt verhält sich dementsprechend anders als Maltodextrine, wie sie in EP 0 688 872 A1 beschrieben und beansprucht werden.

Beispiele 13 bis 21

Das gleiche wie unter Beispielen 4 bis 7 verwendete Poly-(1,4-α-D-glukan) wurde in wässriger Lösung erhitzt, um einen Kleister zu bilden. Dieser wurde auf 10 bzw. 30 Gew.-% Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei –70, 4 und 25°C retrogradiert. Danach wurden die erhaltenen Produkte getrocknet und die thermische Stabilität mit Hilfe der dynamischen Differenzkaloriemetrie (DSC) untersucht.

Die DSC-Messung liefert für die Quellung von nativer Stärke einen endothermen Peak. Ähnliches trifft auch für retrogradierte Stärken und Poly-(1,4-α-D-glukane) zu. An Hand von Endothermen lassen sich die Vorgänge des Schmelzens der Kristallite, der Konformationsänderung sowie der Hydratation und Quellung von Stärkepolymeren charakterisieren.

Messungen unter der Bedingung des Wasserüberschusses (Wassergehalte über 60%) ergeben in der Regel einen einheitlichen Peak. Dieser Peak ist durch verschiedene Parameter, wie on set-Temperatur T_0, Peaktemperatur T_p, Endtemperatur T_c sowie Reaktionsenthalpie dH (Fläche des Peaks) charakterisiert. Die o. g. Bedingung ist für alle in Tabelle 4 aufgeführten Parameter erfüllt.

Die Messungen wurden mit einem hochauflösenden Gerät (DSC120, Fa. Seiko, Japan) durchgeführt. Das Glukan/Wasser-Verhältnis betrug 1 : 5, die Heizrate 4 K/min. Die Messung wurde in einem Temperaturbereich von 10 bis 220°C durchgeführt. Das Gerät arbeitet nach dem Heat Flux-Meßprinzip. Pro Messung wurden 5 mg Polyglukan mittels Ultra-Mikrowaage in Silbertiegel von 70 µl Fassungsvermögen eingewogen und diese nach Zugabe von destilliertem Wasser anschließend hermetisch verschlossen. Als Referenzprobe wurde destilliertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,15 µS verwendet.

Tabelle 4

Bezeichnung Poly-(1,4-α-D-glukan)	Retrogradations-bedingungen Temperatur/Feststoffanteil im Kleister	DSC-Parameter T_0 [°C]	T_p [°C]	T_c [°C]	dH [J/g]
Beispiel					
13	Tieftemperatur-rekristallisation	85,1	102,0	111,3	21,8
14	4 °C, 10 %	81,8	96,7	108,0	16,3
15	4 °C, 30 %	86,2	98,2	103,7	1,8
16		109,3	124,5	136,8	13,3
17		142,7	154,1	165,6	2,9
18	25 °C, 10%	88,6	101,0	109,8	15,0
19	25 °C, 30%	85,9	97,9	101,1	1,7
20		111,8	126,1	133,9	4,0
21		138,1	157,6	172,5	23,0

Diese Beispiele in Tabelle 4 zeigen, daß der Feststoffanteil im Kleister die thermische Stabilität der retrogradierten Produkte beeinflußt. So führt eine Retrogradation bei 30% Feststoffanteil im Kleister zu Produkten, die in DSC-Messungen Endothermen mit mehr als einem Peak zeigen, wobei Peaktemperaturen (T_p) in diesen Endothermen von > 120°C auftreten. Hingegen führt die Retrogradation 10-proz. Kleister zu Produkten, deren Endothermen nur einen Peak mit T_p-Werten zwischen 95 und 100°C aufweisen. Die Erhöhung des Feststoffanteils im Kleister bewirkt somit eine Erhöhung der thermischen Stabilität des retrogradierten Produktes.

Beispiel 22

Bestimmung der Löslichkeit von Polysacchariden und Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

564 mg Poly-(1,4-α-glukan) (siehe Beispiel 1) werden in ca. 0,5 l bidestilliertem Wasser bei 1,3 bar und 130°C für 1,5 Stunden in einem Autoklaven erhitzt (Apparat Certoclav). Von dem Reaktionsgefäß ist zuvor das Gewicht gemessen worden. Danach wird die Apparatur entspannt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Inhalt wird gewogen. Er entspricht 501,74 g. Nach weiteren 24 Stunden wird zentrifugiert und dekantiert. Der feste Rückstand wird getrocknet und ausgewogen. Es sind 468 mg. Daraus errechnet sich ein gelöster Anteil von 96 mg. Bezogen auf das eingesetzte Lösungsmittel errechnet sich daraus, daß für 1 mg Poly-(1,4-α-glukan) 5226 mg Wasser notwendig sind. Gemäß der Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch ergibt sich daraus die Einteilung, daß diese Substanz "sehr schwer löslich" ist, da zwischen 1.000 und 10.000 Teilen Lösungsmittel notwendig sind, um 1 Teil der Substanz in Lösung zu bringen. Dies ist von den 7 Klassen zur Einteilung der Löslichkeit (von "sehr leicht löslich" (Klasse 1) bis "praktisch unlöslich" (Klasse 7)) die Klasse Nummer 6.

Beispiel 23

Bestimmung der Löslichkeit von Polysacchariden und Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

Der Versuch wird wie in Beispiel 22 durchgeführt. Der einzige Unterschied bildet ein Kühlprozeß, der nach der Autoklavbehandlung und dem Abkühlen auf Raumtemperatur nachgeschaltet wird. Das Substanzgemisch wird für 3 Stunden bei 5°C aufbewahrt.

Es werden 526 mg Poly-(1,4-α-glukan) auf ca. 480 ml bidestilliertem Wasser eingewogen. Nach der thermischen Behandlung ergibt sich eine Auswaage von 468,09 g. Das getrocknete Sediment beträgt 488 mg. Demnach sind 38 mg des Poly-(1,4-α-glukans) in Lösung gegangen. Dies entspricht einem Verhältnis von 1 mg Substanz zu 12.305 Teilen Lösungsmittel. Demnach ist die Substanz nach dieser Behandlungsmethode in Klasse Nummer 7 nach DAB einzustufen und danach als praktisch unlöslich zu klassifizieren, weil mehr als 10.000 Teile Lösungsmittel für ein Teil Substanz benötigt werden.

Patentansprüche

1. α-Amylase-resistente Polysaccharide, die Poly-(1,4-α-D-glukane) sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einen RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% aufweisen.
2. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen RS-Gehalt von mindestens 75 und insbesondere mindestens 95 Gew.-%.
3. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Poly-(1,4-α-D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.
4. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5% aufweisen.
5. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in 2- und/ oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1,0% und insbesondere höchstens 0,5% aufweisen.
6. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Poly-(1,4-α-D-glukane) ein Molekulargewicht von $0{,}75 \times 10^2$ bis 10^7, bevorzugt 10^3 bis 10^6 und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 g/mol aufweisen.
7. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Poly-(1,4-α-D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichtes) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.
8. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergenden Ansprüche, erhältlich nach einem Verfahren umfassend folgende Schritte:
 a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;
 b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
 c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
 d) ggfs. Trocknung des erhaltenen Produktes.
9. α-Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, erhältlich nach einem Verfahren umfassend folgende Schritte:
 a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;
 b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;
 c) Retrogradation;
 d) Auftauen der nach Schritt c) erhaltenen Masse; und
 e) ggf. Trocknung oder Entwässerung der nach Schritt d) erhaltenen Masse.
10. Verfahren zur Herstellung von α-Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend folgende Schritte:
 a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;
 b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
 c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur

des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und

d) ggf. Trocknung oder Entwässerung des erhaltenen Produktes.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (a) gemäß Anspruch 10 einen Kleister mit einem Polysaccharid-Gehalt von mindestens etwa 5 und bis zu etwa 30, 35, 40, 45 oder 50 Gew.-% herstellt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (b) gemäß Anspruch 10 den Kleister auf eine Temperatur im Bereich von Raumtemperatur, 50, 60 oder 70 bis 100°C erwärmt oder erhitzt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (c) gemäß Anspruch 10

(i) bei einer Temperatur im Bereich von 50°C bis an den Gefrierpunkt, vorzugsweise 35 bis 15°C, 27 bis 22°C, 16 bis 0°C oder 6 bis 2°C und/oder

(ii) für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, vorzugsweise 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h

retrogradiert.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (c) gemäß Anspruch 10 nach einem Temperaturstufenprogramm

(i) in einem Temperaturbereich von 100 bis 0°C und vorzugsweise 90 bis 4°C

(ii) für ein Gesamtzeitintervall von 8 bis 36 h, vorzugsweise 20 bis 28 h und insbesondere 22 bis 26 h gemäß dem folgenden Temperatur-Zeit-Programm stufenweise und gegebenenfalls unter Einwirkung von Scherkräften abkühlt und retrogradiert, wobei sich die gewählten Zeitintervalle zu einem vorstehend angegebenen Gesamt-Zeitintervall ergänzen:

Temperatur-Zeit-Programm

Temperatur (°C)	Zeitintervall
90 ± 10	5 min ± 5 min
80 ± 10	10 min ± 10 min
70 ± 10	(30 bis 180 min) ± 30 min
40 ± 10	(60 bis 180 min) ± 60 min
25 ± 10	22 h ± 15 h
4 ± 10	20 h ± 15 h

15. Verfahren zur Herstellung von α-Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend folgende Schritte:

a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukanen) und Wasser;

b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;

c) Retrogradation;

d) Auftauen der nach Schritt (c) erhaltenen Masse; und

e) ggf. Trocknung oder Entwässerung der nach Schritt (d) erhaltenen Masse.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man die gemäß Schritt (d) aufgetaute Masse noch einmal oder mehrmals den Schritten (b) bis (d) unterwirft, bevor man endgültig auftaut, trocknet oder entwässert.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (b) gemäß Anspruch 15 die erhaltene Suspension oder Dispersion auf eine Temperatur im Bereich 0°C bis –80°C abkühlt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (c) gemäß Anspruch 15 für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, bevorzugt 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h retrogradiert.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Stufe (a) gemäß Anspruch 10 oder Anspruch 15 von Poly-(1,4-α-D-glukanen) ausgeht, die aus Biotransformation, aus Umsetzung mit Enzymen oder aus Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen worden sind.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5% aufweisen.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) in 2- oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1% und insbesondere höchstens 0,5% aufweisen.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) ein Molekulargewicht von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7, bevorzugt 10^3 bis 10^6 g/mol und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 aufweisen.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4-α-D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichts) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man α-Amylase-resistente Polysaccharide mit einem RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% gewinnt.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (e) gemäß Anspruch 10 oder bei Schritt (d) gemäß Anspruch 11 das retrogradierte Produkt durch Sprüh- oder Gefriertrocknung trocknet.

27. Verwendung eines α-Amylase-resistenten Polysaccharids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 für Lebensmittel-Vorprodukte oder Lebensmittel.
28. Verwendung eines α-Amylase-resistenten Polysaccharids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 als Lebensmitteladditiv oder Lebensmittelzusatzstoff.
29. Lebensmittel-Vorprodukt oder Lebensmittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem α-Amylase-resistenten Polysaccharid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Nummer: DE 198 30 618 A1
Int. Cl.[7]: C 08 B 37/00
Offenlegungstag: 13. Januar 2000

Fig. 1 **GPC-Chromatogramm des Poly-(1,4-α-D-glukans)**

